

学 位 論 文 要 旨

氏名 鈴木 尋

題 目 : An arthropods role in the life cycle of *Francisella tularensis*
(節足動物が野兎病菌の生活環に果たす役割)

論文要旨 :

野兎病菌 (*Francisella tularensis*) はユーラシア大陸と北米大陸の北部中心に分布しており、ヒトでは散発的に感染部の皮膚潰瘍や所属リンパ節の腫脹、風邪様の症状などを引き起こすことが知られている。日本国内における野兎病菌は吸血節足動物と野生動物によって維持されていることが疑われており、野兎病菌の感染をコントロールするためには、節足動物を主とした環境中における生活環を詳細に把握することが必須であると考えられる。しかしながら、保有媒介節足動物に焦点を当てた研究はこれまでにほとんどなく、その主たる保有節足動物の種類ですら不明な状況にあった。

そこで、第 1 章では国内において採取されたマダニから抽出された DNA を用いた大規模な疫学調査を行い、野兎病菌を保有しているマダニ種の特定を試みた。その結果、日本国内における野兎病菌はヤマトマダニ (*Ixodes ovatus*) とシュルツェマダニ (*I. persulcatus*) の 2 種類を主として維持されていることが明らかとなった。このうちシュルツェマダニを用いた感染モデルを作成し、野兎病菌の体内生存能を検討した結果、感染後 2 週間に及ぶ野兎病菌の長期生存が確認された。このことはシュルツェマダニは野兎病菌の宿主として重要な役割を担っているという疫学調査の結果を強く裏付けるものであり、*Ixodes* 属のマダニ体内における野兎病菌の生存を実験的に再現しうることを示唆するものであった。さらに 25°C 培養条件下の野兎病菌において特異的に発現している因子の遺伝子変異株を用いてマダニ体内における増殖を評価した結果、I 型分泌装置の重要な構成因子である Hly D を欠損した株で増殖率が有意に減少した。I 型分泌装置は大腸菌をはじめとする他の細菌において溶血素を分泌する重要な病原因子のひとつとして知られている。一方で登録されている遺伝子配列の解析から、野兎病菌においてはごく一部の株を除き、Hly D 以外の I 型分泌装置の構成遺伝子が保存されていないことが確認された。これらの結果から、野兎病菌は節足動物体内で生存・増殖するために特異的な機構を有しており、Hly D がその一端を担っている可能性が示唆された。しかしながら、マダニを用いた研究は供試サンプル数や体サイズから、野兎病菌と宿主節足動物との関係性を明らかにすることは難しかった。

そのため第 2 章においては、より簡便に用いることが出来る新たな節足動物モデルとしてカイコ (*Bombyx mori*) を用いて、体内における野兎病菌の動態の解析を行った。カイコの体内に直接大腸菌 (*Escherichia coli*) および野兎病菌を注入し体内菌数を経時的に測定した結果、大腸菌は速やかに体内から排除されるのに対して野兎病菌では体内において生存・増殖し、菌数が 1 週間以上維持されることが確認された。また蛍光色素を導入した野兎病菌を用いた実験により、血球細胞内に侵入してい

(別紙様式第 3 号)

ることが確認された。さらに、カイコにおける細胞性免疫として知られている体液のメラニン化および体組織へのノジュールの付着に着目し実験を行ったところ、野兎病菌の感染に対してはこれらの反応が抑制されていることが明らかとなった。その一方で、液性免疫として知られている抗菌ペプチドの産生について検討したところ、野兎病菌感染カイコにおいて、持続的に発現が上昇していることが確認された。この野兎病菌をあらかじめ感染させたカイコに、病原細菌として知られる黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) を重感染させたところ、対照群と比較して生存率の向上と体内黄色ブドウ球菌数の減少が確認された。これらのことから、野兎病菌は節足動物の体内において体内に適応するために細胞性免疫を抑制しているのみならず、抗菌ペプチドによる宿主の感染抵抗性を向上していることが示唆された。この抵抗性の向上は宿主節足動物の環境中における生存率の上昇につながると考えられ、野兎病菌はその生活環において節足動物宿主との共生関係を構築していることが示唆された。

カイコ感染モデルにおいて検討したメラニン化やノジュールの形成、抗菌ペプチドといった免疫反応はマダニや蚊などの野兎病菌の媒介節足動物をはじめとした、節足動物に広く保存されている生体防御機構である。本研究の成果により、日本における環境中の野兎病菌保有節足動物が明らかになるとともに、これまでにまったく不明であった節足動物への適応機構の一端が明らかとなった。また、節足動物の内部共生細菌に関する研究には近年注目が高まっているが、病原細菌と媒介節足動物の共生関係を明らかにした報告はこれまでになく、環境中の野兎病菌の動態を把握、ひいては制御するために非常に重要な知見であると考えられる。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	鈴木 尋
審査委員	主査： 山口大学 教授 度会 雅久
	副査： 鳥取大学 教授 村瀬 敏之
	副査： 山口大学 教授 佐藤 宏
	副査： 山口大学 准教授 清水 隆
	副査： 山口大学 准教授 高野 愛
題目	An arthropods' role in the life cycle of <i>Francisella tularensis</i> (節足動物が野兎病菌の生活環に果たす役割)

審査結果の要旨：

野兎病菌(*Francisella tularensis*)はヒトにおいて散発的に感染部の皮膚潰瘍や所属リンパ節の腫脹などの症状を引き起こし、人獣共通感染症の原因となることが知られている。野生動物や媒介節足動物などの環境中に存在する病原巣が感染に重要な役割を果たしており、野兎病をコントロールするためには、環境中の病原体の動態を詳細に把握することが必須であると考えられる。しかしながら、節足動物体内における野兎病菌の動態はほとんど解明されていない。

そこで本論文では、日本国内に生息するダニにおける野兎病菌の分布状況の調査とダニ体内における野兎病菌の増殖について解析を行った。さらに、新たな節足動物モデルとしてカイコ(*Bombyx mori*)を用いて、カイコ体内における野兎病菌の動態の解析を行った。結果は以下のとおりである。

1) 日本国内のダニからの野兎病菌の検出とダニ体内における菌の増殖

日本国内に生息するマダニから DNA を抽出し、4527 検体を供試した。これらのサンプルに野兎病菌由来の DNA が存在するか否か real-time PCR および nested PCR により解析を行った。野兎病菌の DNA を特異的に検出するプライマーを用いて real-time PCR で解析したところ、ヤマトマダニ(*Ixodes ovatus*)が 2.15%(45/2093)、シュルツェマダニ(*I. persulcatus*)が 0.66%(14/2107)、ヒトツトゲマダニ(*I. monospinosus*)が 8.22%(6/73)、およびキチマダニ(*Haemaphysalis flava*)が 0.72%(1/138)の陽性率を示した。また nested PCR で解析した結果、ヤマトマダニで 42 検体、およびシュルツェマダニで 5 検体陽性を示した。ヤマトマダニおよびシュルツェマダニから分離された野兎病菌由来 DNA の系統解析を行ったところ、ユーラシア大陸に分布する野兎病菌タイプ B に近縁であることが認められた。

マダニ体内における野兎病菌の動態を調べるために、シュルツェマダニ体内へ野兎病菌の生菌と熱処理した死菌を注入した。これらのマダニから DNA を抽出し、野兎病菌由来の DNA を real-time PCR を用いて定量することにより、菌量の比較検討を行った。その結果、野兎病菌はマダニ体内で生存し続けることが示唆された。さらに病原因子の一つとして考えられている HlyD の欠損株では親株に比べ、速やかにマダニ体内から排除されることが明らかとなった。以上結果から、野兎病菌はマダニ体内で維持され、それには HlyD が関与することことが示された。

2) 野兎病菌のカイコ内共生と宿主抵抗性

新たな節足動物モデルとしてカイコ(*Bombyx mori*)を用いて、カイコ体内における野兎病菌の動態の解析を行った。その結果、野兎病菌はカイコ体内で排除されず共生することが明らかとなった。菌の多くは hemolymph の中に認められた。カイコの免疫応答として、メラニン化とノジュール形成が知られている。野兎病菌の感染によりメラニン化とノジュール形成の阻害が認められた。また、野兎病菌が共生することによってカイコ体内での抗菌ペプチドの産生が増加し、外来の病原体の感染を阻害することが示された。これらの結果から、野兎病菌の共生がカイコの生存に重要な利益をもたらすことが示唆された。自然界における野兎病菌の生態は全く不明であったが、節足動物が生息場所として重要な役割を果たすことが明らかとなった。

以上により、審査委員一同は博士(獣医学)の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。